

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06856

研究課題名（和文）膵β細胞におけるインスリンの品質管理に関与する新規膜蛋白の解析

研究課題名（英文）Functional analysis of a novel membrane protein involved in the quality control of insulin in pancreatic beta cells

研究代表者

宮崎 純一（Miyazaki, Jun-ichi）

大阪大学・産業科学研究所・特任教授

研究者番号：10200156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膵細胞株MIN6を用いてインスリン分泌制御に関与する候補遺伝子として見出したTmem59lに関し、ノックアウト（KO）マウス及を作製し解析を行った。TMEM59Lは細胞のゴルジ体や分泌顆粒に局在していた。KOマウスは見た目に異常はないが、雄では体重増加がヘテロマウスより低下した。KO雄マウスに経口糖負荷試験を行ったところ、50週齢では耐糖能低下が認められた。膵細胞におけるTmem59l機能を解析するためKOとrescue細胞株を樹立した。電子顕微鏡観察ではインスリン分泌顆粒数とその電子密度がKO細胞では低く、KO細胞はrescue細胞に比し、高グルコースでインスリン分泌が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病は生活習慣の変化に伴い増加している。糖尿病の抜本的な治療のためにもインスリンを産生・分泌する膵細胞の機能、特にグルコース応答性インスリン分泌（GSIS）の低下に影響する遺伝子に関する研究が重要である。GSISの低下に相関して発現が低下する遺伝子群を研究代表者らのグループで独自に探索し見出したTmem59l遺伝子に関し、本研究でノックアウトマウス、ノックアウト膵細胞株MIN6を用いて、詳細な機能解析を行った。その結果、TMEM59L蛋白が、ゴルジ装置、インスリン分泌顆粒に局在し、インスリン分泌制御で重要な役割を果たしていることが示された。今後、糖尿病発症機構との関連が注目される、

研究成果の概要（英文）：Using the pancreatic cell line MIN6, Tmem59l was identified as a candidate gene involved in the regulation of insulin secretion. To analyze the function of TMEM59L, knockout (KO) mice were generated, and their detailed analyses were performed. TMEM59L was localized to the Golgi apparatus and secretory granules of cells. KO mice had no abnormal appearance, but after 15 weeks of age, weight gain in males was lower than in heterozygous mice. When an oral glucose tolerance test was performed on KO male mice, decreased glucose tolerance was observed at 50 weeks of age. To analyze Tmem59l function, we established a Tmem59l KO cell line and its rescue cell line. Electron microscopy showed that the number of insulin secretory granules and their electron density tended to be lower in KO cells, and insulin secretion was also lower in KO cells than in rescue cells when exposed to high glucose.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病 インスリン分泌 膵細胞 ノックアウトマウス インスリンプロセッシング 耐糖能異常

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は生活習慣の変化に伴い増加している。糖尿病の抜本的な治療のためにもインスリンを産生・分泌する膵細胞の機能、特にグルコース応答性インスリン分泌 (GSIS) の低下に影響する遺伝子を同定し、その機能を解析することが重要である。そこで、GSIS の低下に相関して発現が低下する遺伝子群を研究代表者らのグループで独自に探索し、得られた候補遺伝子の中で注目したのが、*Tmem59l* 遺伝子である。実際、グルコース応答性インスリン分泌を示す膵細胞株 MIN6 において、*Tmem59l* 遺伝子をノックダウンすると、インスリン分泌の低下が示された (Kobayashi M *et al.*, *PLoS ONE* 11: e0151927, 2016)。

## 2. 研究の目的

膵細胞のインスリン分泌は生体の血糖値制御の根幹を成す重要な機構である。膵細胞で産生されたプロインスリンのうち、20%程度はmisfoldingなどにより成熟インスリンにまで至らないとされ、misfoldingを起こしやすい分子と考えられる。このようなmisfoldingは、インスリン遺伝子のミスセンス変異により過度に進行し、若年性糖尿病を引き起こす (Mutant INS-gene Induced Diabetes of Youth (MIDY) syndrome)。正常プロインスリン分子であっても、Cys(B19)同士などで分子間結合が起こり、プロインスリン複合体形成が起こる。前糖尿病病態においては、このような異常プロインスリンが蓄積し、ERストレスを介して細胞の機能不全を進行させている可能性が考えられている。そのため、プロインスリンの成熟 (foldingやプロセッシング) を担当する分子とその機能異常により引き起こされる病態と異常プロインスリン分子の解析は、2型糖尿病の発症機構とも関連し、注目すべき課題である。

マウス膵細胞株MIN6は、グルコース応答性インスリン分泌を維持している細胞株として、世界中で広く研究に使われている。我々は以前、MIN6細胞を用いてインスリン分泌制御に関与している候補遺伝子を探索し、*Tmem59l* 遺伝子を見出した。TMEM59L蛋白はゴルジ体、分泌顆粒に局在しており、インスリン分泌顆粒の形成や動態を制御している可能性が考えられた。生体におけるTMEM59Lの機能をさらに解析するため、*Tmem59l* ノックアウト (KO) マウスを作製したところ、マウスは見た目には異常はなく妊孕性にも異常はなかったが、週齢が15週を越すと野生型マウスに比し、体重増加が低下する傾向が見られた。本研究は、*Tmem59l*-KOによるインスリン分泌の異常とその機構をマウスおよび培養細胞をもちいて詳細に解明することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) *Tmem59l*-KOマウスを用いた解析

TMEM59Lは脳や肺、精巣などで発現しており、細胞内ではゴルジ体に局在することが報告されているが (Zheng Q *et al.*, *Mol Neurobiol* 54:4189, 2017)、申請者らは膵細胞株MIN6においても高いレベルで発現し、ゴルジ体と分泌顆粒に局在することを示した (Kobayashi M *et al.*, *PLoS One* 11: e0151927, 2016)。我々が作成した*Tmem59l*-KOマウスは見た目には異常はなく、妊孕性も維持されていた。ホモ、ヘテロKOマウスについて、週齢を追って体重増加を調べる。さらにKOマウスを用いて、経口糖負荷試験 (OGTT) を行う。

### (2) *Tmem59l* 欠損インスリノーマ細胞株の作製と解析

*Tmem59l* 遺伝子はもともと長期培養した high passage MIN6 細胞において発現が低下する遺伝子として見出されたものである。*Tmem59l*-KO マウスをインスリノーマを発症する IT6 トランスジェニックマウス (Miyazaki J *et al.*, *Endocrinology* 127:126, 1990) と交配し、得られた *Tmem59l*-KO IT6 マウスに発生したインスリノーマから *Tmem59l* KO 細胞株を樹立した。

この細胞を用いた解析では、野生型 MIN6 細胞株、*Tmem59l* KO 細胞株と、KO 細胞株に *Tmem59l* をレンチウイルスベクターを用いて発現させた rescue 細胞を使用し、3群間で以下の解析を行い、比較検討する。

電子顕微鏡によるインスリン分泌顆粒の観察：インスリン分泌顆粒の数や局在、電子密度を観察する。

ウェスタンブロットによる解析：インスリンのプロセッシング異常やmisfoldingについては、ウェスタンブロットにより解析する。サンプルは、細胞から抽出した蛋白を用い、小分子用のゲルを用いて還元、非還元条件でSDS-PAGEを行う。正常にプロセッシングされていなければ、プロインスリンやsplit proinsulin、多量体が見られると考えられる。

グルコースや KCl 応答性インスリン分泌、インスリン含量の測定：*Tmem59l* KO による細胞機能の異常を検出するとともに、*Tmem59l* 発現を回復させる (rescue) ことによりそれがどの程度改善するか検討する。

## 4. 研究成果

### (1) *Tmem59l*-KOマウスを用いた解析

老齢になると、特に雄で体重増加不良が見られた (下図；左)。その原因を調べるために、

*Tmem59l*-KOマウスを用いて、経口糖負荷試験(OGTT)を行った。15週齢ではヘテロ、ホモKOマウス間で有意差はなかったが、50週齢ではホモKOマウス(雄)で耐糖能の有意な低下が認められた(下図;右)。老齢のホモKOマウスで、耐糖能が低下していることから、分泌されるインスリン量が低下している、あるいは正常な機能を有しない可能性が考えられた。インスリン分泌量に関しては、OGTT 15分値で、KOマウスで低下していることが示された。ホモとヘテロKOマウスにOGTTおこなったときに分泌された(プロ)インスリンについて、プロインスリン/インスリン比を算出したところ、ホモマウスではその比率が上昇していた。

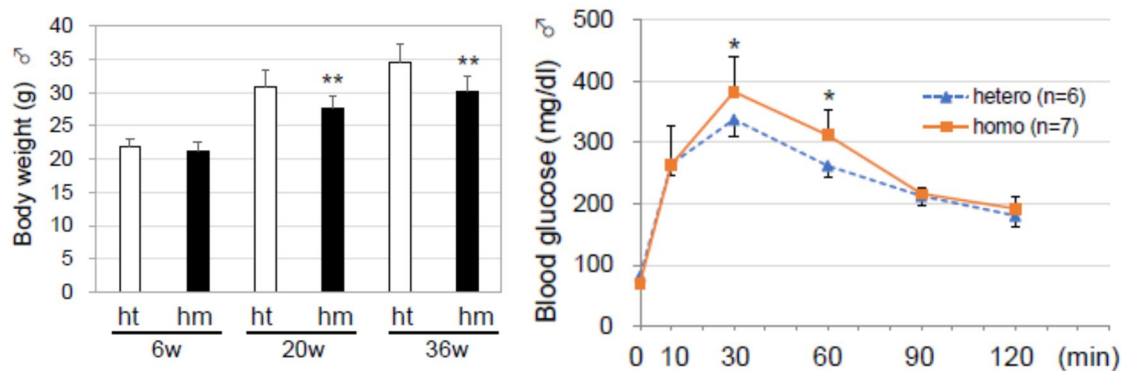


図1 ホモ(hm)ヘテロ(ht)KOマウスの解析

さらに70週令のホモ・ヘテロKOマウスの膵組織をもちいてプロインスリンとインスリンの免疫染色を行ったところ、興味深いことに、ホモKOマウスの膵島では、プロインスリンのみが染色される細胞が散見された(下図、矢印)。プロインスリンは、proprotein convertase (PC)1/3やPC2、carboxypeptidase EによってインスリンとC-peptideにプロセッシングされることが知られている。プロインスリンのみが染色された細胞においては、これらの蛋白の発現が低下している可能性が考えられた。

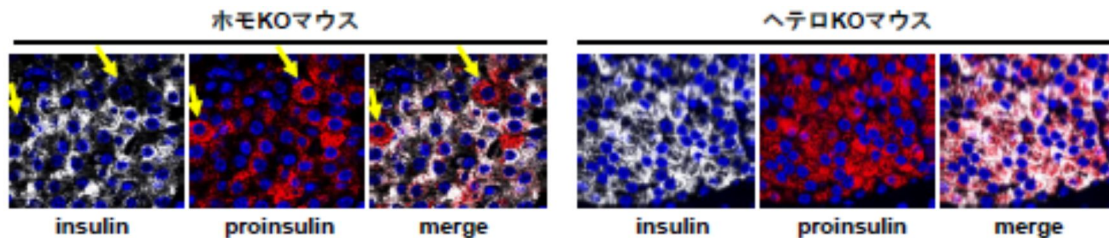


図2 ホモ・ヘテロ KOマウスの膵島における(プロ)インスリン発現の解析

## (2) *Tmem59l*-KO MIN6細胞を用いた解析

電子顕微鏡にてインスリン分泌顆粒を観察したところ、野生型MIN6細胞に比べ、*Tmem59l*-KO細胞ではインスリン分泌顆粒の電子密度が低下していたが、rescue細胞ではMIN6細胞と同程度に回復していた。

MIN6-*Tmem59l*-KO細胞におけるグルコース応答性インスリン分泌は、特に25 mM glucoseに対して反応が低下していたが、KClに対するインスリン分泌量は正常に保たれていた。rescue細胞では、25mMグルコースにおけるインスリン分泌が有意に回復していたが、分泌量としては少し低い値であった。*Tmem59l*の発現レベルが至適ではなかった可能性がある。

今後は、TMEM59L蛋白の機能をさらに明らかにする目的で、他の蛋白との相互作用や分泌されたインスリンのプロインスリン/インスリンの比率などの解析を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Miyazaki Satsuki, Tashiro Fumi, Tsuchiya Takashi, Sasaki Kazuki, Miyazaki Jun-ichi  | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Establishment of a long-term stable $\alpha$ -cell line and its application to analyze the effect of Gcg expression on insulin secretion             | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>477       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-020-79992-7   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Nagai Yasuki, Matsuoka Taka-aki, Shimo Naoki, Miyatsuka Takeshi, Miyazaki Satsuki, Tashiro Fumi, Miyazaki Jun-ichi, Katakami Naoto, Shimomura Iichiro | 4. 巻<br>556             |
| 2. 論文標題<br>Glucotoxicity-induced suppression of Cox6a2 expression provokes $\alpha$ -cell dysfunction via augmented ROS production                              | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>134 ~ 141 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2021.03.148   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Yoshioka Keitaro, Yamashita Haruki, Shimizu Kazunori, Shimomura Sayako, Shibata Takahiro, Miyazaki Jun-ichi, Honda Hiroyuki                           | 4. 巻<br>550             |
| 2. 論文標題<br>Screening of a novel free fatty acid receptor 1 (FFAR1) agonist peptide by phage display and machine learning based-amino acid substitution          | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>177 ~ 183 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2021.02.142   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |
| 1. 著者名<br>Miyazaki Satsuki, Yamano Hiroyuki, Motooka Daisuke, Tashiro Fumi, Matsuura Takumi, Miyazaki Tatsushi, Miyazaki Jun-ichi                               | 4. 巻<br>6               |
| 2. 論文標題<br>Zfp296 knockout enhances chromatin accessibility and induces a unique state of pluripotency in embryonic stem cells                                  | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>771       |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-023-05148-8   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考            |
|-------|---|-----------------------------------|---------------|
| 研究分担者 | 田代 文<br><br>(Tashi ro Fumi)<br><br>(40136213)     | 大阪大学・医学系研究科・助教<br><br><br>(14401) | 削除：2022年3月15日 |
| 研究分担者 | 宮崎 早月<br><br>(Miyazaki Satsuki)<br><br>(60452439) | 大阪大学・医学系研究科・助教<br><br><br>(14401) |               |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                |  |  |
|---------|------------------------|--|--|
| 米国      | Joslin Diabetes Center |  |  |